



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 101 17 085.8

Anmeldetag: 6. April 2001

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pan-
tothensäure unter Verwendung coryneformer Bakte-
rien

Priorität: 30.9.2000 DE 100 48 604.5

IPC: C 12 N, C 12 P, C 07 H

Bemerkung: Die nachgereichte Seite 7 der Beschreibung ist am
3. Juli 2001 eingegangen.

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 29. August 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Brand

Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung coryneformer Bakterien

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung coryneformer Bakterien in denen das poxB-Gen abgeschwächt ist.

Stand der Technik

Die Pantothensäure stellt ein kommerziell bedeutendes Vitamin dar, das in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung findet.

Pantothensäure kann durch chemische Synthese oder biotechnisch durch Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährlösungen hergestellt werden. Bei der chemischen Synthese ist das DL-Pantolacton eine wichtige Zwischenstufe. Es wird in einem mehrstufigen Verfahren aus Formaldehyd, Isobutylaldehyd und Cyanid hergestellt. In weiteren Verfahrensschritten wird das racemische Gemisch aufgetrennt, D-Pantolacton mit β -Alanin kondensiert und so die gewünschte D-Pantothensäure erhalten.

Der Vorteil der fermentativen Herstellung durch Mikroorganismen liegt in der direkten Bildung der gewünschten stereoisomeren D-Form, die frei von L-Pantothensäure ist.

Verschiedene Arten von Bakterien, wie z.B. Escherichia coli (E. coli), Arthrobacter ureafaciens, Corynebacterium erythrogenes, Brevibacterium ammoniagenes und auch Hefen, wie z.B. Debaryomyces castellii können wie in EP-A 0 493 060 gezeigt, in einer Nährlösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, D-Pantothensäure produzieren. EP-A 0 493 060 zeigt weiterhin, daß bei E. coli durch Amplifikation von Pantothensäure-Biosynthesegenen aus E.

coli, die auf den Plasmiden pFV3 und pFV5 enthalten sind, in einer Nährlösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, die Bildung von D-Pantothersäure verbessert wird.

- 5 EP-A 0 590 857 und US-Patent 5,518,906 beschreiben von E. coli Stamm IFO3547 abgeleitete Mutanten, wie FV5714, FV525, FV814, FV521, FV221, FV6051 und FV5069, die Resistenzen gegen verschiedene Antimetabolite wie Salizylsäure, α -Ketobuttersäure, β -Hydroxyasparaginsäure, O-Methylthreonin
- 10 und α -Ketoisovaleriansäure tragen. Sie produzieren in einer Nährlösung, die Glucose enthält, Pantoinsäure, und in einer Glucose- und β -Alanin-haltigen Nährlösung D-Pantothersäure. In EP-A 0 590 857 und US-Patent 5,518,906 wird weiterhin gezeigt, daß nach Amplifikation der
- 15 Pantothersäure-Biosynthesegene, die auf dem Plasmid pFV31 enthalten sind, in den oben genannten Stämmen in glucosehaltigen Nährlösungen, die Produktion von D-Pantoinsäure und in einer Nährlösung, die Glucose und β -Alanin enthält, die Produktion von D-Pantothersäure verbessert wird.
- 20 Verfahren zur Herstellung von D-Pantothersäure mit Hilfe von *Corynebacterium glutamicum* (C. glutamicum) sind in der Literatur nur ansatzweise bekannt. So berichten Sahn und Eggeling (Applied and Environmental Microbiology 65(5), 1973-1979 (1999)) über den Einfluss der Überexpression der
- 25 Gene panB und panC und Dusch et al. (Applied and Environmental Microbiology 65(4), 1530-1539 (1999)) über den Einfluß des Gens panD auf die Bildung der D-Pantothersäure.

Aufgabe der Erfindung

- 30 Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Grundlagen für verbesserte Verfahren zur fermentativen Herstellung von Pantothersäure mit coryneformen Bakterien bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Wenn im Folgenden D-Pantothensäure oder Pantothensäure oder Pantothenat erwähnt werden, sind damit nicht nur die freien Säuren, sondern auch die Salze der D-Pantothensäure wie
5 z.B. das Calcium-, Natrium-, Ammonium- oder Kaliumsalz gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen die für das
10 Enzym Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierende Nucleotidsequenz (poxB-Gen) abgeschwächt wird.

Gegenstand dieser Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure in dem folgende Schritte durchführt werden:

- 15 a) Fermentation der D-Pantothensäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen zumindest die für die Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierende Nucleotidsequenz (poxB) abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet wird;
- 20 b) Anreicherung der D-Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien; und
- c) Isolierung der produzierten D-Pantothensäure.

Die eingesetzten Stämme produzieren gegebenenfalls bereits vor der Abschwächung des poxB-Gens D-Pantothensäure.

25 Bevorzugte Ausführungsformen finden sich in den Ansprüchen.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die
30 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel

verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein) mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

- 5 Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können D-Pantothensäure aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um Vertreter coryneformer Bakterien,
- 10 insbesondere der Gattung *Corynebacterium*. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.
- Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere
- 15 der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind beispielsweise die bekannten Wildtypstämme

- Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
- Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806
- Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
- 20 *Corynebacterium melassecola* ATCC17965
- Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539
- Brevibacterium flavum* ATCC14067
- Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und
- Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

- 25 und daraus hergestellte, D-Pantothensäure produzierende Mutanten wie beispielsweise

Corynebacterium glutamicum ATCC13032 Δ ilvA/pEC7panBC

Corynebacterium glutamicum ATCC13032/pND-D2.

- Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach
- 30 Abschwächung des für die Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierenden *poxB*-Gens in verbesserter Weise Pantothensäure produzieren.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Nukleotidsequenz des poxB-Gens ist in der SEQ ID No. 1 und die sich daraus ergebende Aminosäuresequenz des Enzymproteins in SEQ ID No. 2 dargestellt.

10 Das in der SEQ ID No. 1 beschriebene poxB-Gen kann erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können Allele des poxB-Gens verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch funktionsneutrale Sinnmutationen („sense mutations“) 15 ergeben.

Eine neue, in SEQ ID No. 6 dargestellte Nukleotidsequenz wurde gefunden, die stromaufwärts der in SEQ ID No. 1 dargestellten Nukleotidsequenz der poxB-Genregion liegt. Weiterhin wurde eine neue, in SEQ ID No. 7 dargestellte 20 Nukleotidsequenz gefunden, die stromabwärts der in SEQ ID No. 1 dargestellten Nukleotidsequenz der poxB-Genregion liegt. Auf diese Weise wurde die in SEQ ID No. 4 dargestellte Sequenz der poxB-Genregion erhalten.

Es wurde gefunden, daß diese Polynukleotide dargestellt in 25 SEQ ID No. 6 und 7, nützlich sind in der Herstellung von Mutanten mit abgeschwächtem, insbesondere ausgeschaltetem poxB-Gen.

Es wurde auch gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des poxB-Gens in verbesserter Weise 30 Pantothensäure produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung kann entweder die Expression des poxB-Gens oder die katalytischen

Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt bzw. ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Erniedrigung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung („Mutation“) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Patek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine

Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), die dazu führen, daß falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Ein Beispiel für ein Plasmid, mit Hilfe dessen eine Insertionsmutagenese des poxB-Gens durchgeführt werden kann, ist pCR2.1poxBint (Figur 1).

Plasmid pCR2.1poxBint besteht aus dem von Mead et al. (Bio/Technology 9:657-663 (1991)) beschriebenen Plasmid pCR2.1-TOPO, in das ein internes Fragment des poxB-Gens, dargestellt in SEQ-ID No. 3, eingebaut wurde. Dieses Plasmid führt nach Transformation und homologer Rekombination in das chromosomale poxB-Gen (Insertion) zu einem Totalverlust der Enzymfunktion.

Ein anderes Beispiel für ein mutiertes poxB-Gen ist das in Plasmid pCRB1-poxBdel (Figur 2) enthaltene Δ poxB-Allel. Das

ApoxB-Allel enthält lediglich die 5'- und die 3'-Flanke des poxB-Gens. Der 1737 bp lange Abschnitt der Kodierregion fehlt (Deletion). Die Nukleotidsequenz des ApoxB-Allels bzw. der 5'- und der 3'-Flanke ist in der SEQ ID No. 12 dargestellt. Dieses ApoxB-Allel kann durch Integrationsmutagenese in coryneforme Bakterien eingebaut werden. Hierzu bedient man sich des oben angegebenen Plasmides pCRB1-poxBdel oder überführt das ApoxB-Allel in das Plasmid pK18mobsacB und verwendet das dabei entstehende Plasmid vom Typ pK18mobsacBpoxBdel. Nach Übertragung durch Konjugation oder Transformation und homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden „cross over“-Ereignisses und eines zweiten, eine Excision bewirkenden „cross over“-Ereignisses im poxB-Gen erreicht man den Einbau des ApoxB-Allels und erzielt einen Totalverlust der Enzymfunktion in dem jeweiligen Stamm. Das durch SEQ ID No. 12 charakterisierte ApoxB-Allel ist Gegenstand der Erfindung.

Anleitungen und Erläuterungen zur Insertionsmutagenese bzw. Integrationsmutagenese und Genaustausch findet man beispielsweise bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9,84-87 (1991)), Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915-927 (1998)) oder Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)).

Weiterhin kann es für die Produktion von Pantothenensäure vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des für die Pyruvat-Oxidase kodierenden Gens eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase kodierende panB-Gen (Sahm et al., Applied and Environmental Microbiology, 65, 1973-1979 (1999)),
- das für die Pantothenat-Synthetase kodierende panC-Gen (Sahm et al., Applied and Environmental Microbiology, 65, 1973-1979 (1999)),

- das für die Acetohydroxysäure Isomeroreduktase kodierende ilvC-Gen (EMBL-GenBank: Accession Nr. L09232), und
- das für die Dihydroxysäure-Dehydratase kodierende ilvD-Gen (EP-A-1006189);

zu verstärken, insbesondere zu überexprimieren.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Weiterhin kann es für die Produktion von Pantothersäure vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des für die Pyruvat-Oxidase kodierenden Gens das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-Carboxykinase) kodierende pck-Gen (DE: 19950409.1, DSM 13047) abzuschwächen.

Schließlich kann es für die Produktion von Pantothersäure vorteilhaft sein, neben der Abschwächung der Pyruvat-Oxidase unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982), die die Produktion der Pantothersäure vermindern.

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Pantothersäure-Produktion kultiviert werden.

Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas
5 (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenerer
10 Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose,
15 Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe
20 können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische, Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat,
25 Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-
30 haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe, wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben

- genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies zur zusätzlichen Steigerung der Pantothensäure-Produktion Vorstufen der Pantothensäure, wie Aspartat, β -Alanin, Ketoisovalerat, Ketopantoinsäure oder
- 5 Pantoinsäure, und gegebenenfalls deren Salze zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.
- 10 Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B.
- 15 Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, z.B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff-
- 20 haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an Pantothensäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise
- 25 innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Konzentration an gebildeter Pantothensäure kann mit bekannten chemischen (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)) oder mikrobiologischen Verfahren wie z.B. dem *Lactobacillus plantarum* Test (DIFCO MANUAL, 10th

30 Edition, S. 1100-1102; Michigan, USA) bestimmt werden.

Folgender Mikroorganismus wurde am 19. Oktober 1999 als Reinkultur bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli Stamm DH5 α /pCR2.1poxBint als DSM 13114.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

- 5 Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei
Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben,
isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham
10 Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung
Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-
Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche
Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland,
Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)
15 dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1
(Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of
Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem
20 Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,
Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)
gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase
dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym
25 BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.
Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der
behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-
DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
30 Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04)
behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit
Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La
Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing

Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt. Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension
5 vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation
10 über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des poxB-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep
15 Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit
20 shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp
25 mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde
30 mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold

- Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm
- 5 DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al., 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 μ g/ml Zeocin ausplattiert.
- 10 Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-
- 15 5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und
- 20 Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).
- 25 Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte
- 30 Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1737 Basenpaaren, welches als poxB-

Gen bezeichnet wurde. Das poxB-Gen kodiert für ein Polypeptid von 579 Aminosäuren dargestellt in SEQ ID No. 2.

Beispiel 3

Herstellung des Integrationsvektors pCR2.1poxBint für die
5 Mutagenese des poxB-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für C. glutamicum bekannten Sequenz des poxB-Gens wurden die
10 folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion ausgewählt:

poxBint1:

5' TGC GAG ATG GTG AAT GGT GG 3'

poxBint2:

15 5' GCA TGA GGC AAC GCA TTA GC 3'

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press)
20 mit Pwo-Polymerase der Firma Boehringer die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde ein ca. 0,9 kb großen DNA-Fragment isoliert, welches ein internes Fragment des poxB-Gens trägt und in der SEQ ID No. 3 dargestellt ist.

25 Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K4500-01) in den Vektor pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991) Bio/Technology 9:657-663) ligiert. Anschließend wurde der E. coli Stamm Top10F' (Grant et al.
30 (1990) Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 87:4645-4649) elektroporiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al.,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), der mit 50 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des

5 QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pCR2.1poxBint (Figur 1) genannt.

Beispiel 4

10 Herstellung eines Austauschvektors für die Deletionsmutagenese des poxB-Gens

4.1 Bestimmung der Nukleotidsequenz der Flanken des poxB-Gens

In weiteren Sequenzierschritten wurde die Nukleotidsequenz

15 der in SEQ ID No. 1 dargestellten poxB-Genregion um jeweils ca. 500 bis 600 bp stromaufwärts und stromabwärts erweitert. Hierzu wurde die in Beispiel 2 beschriebene Methodik angewendet. Auf diese Weise wurde die in SEQ ID No. 4 dargestellte, erweiterte Nukleotidsequenz der poxB-

20 Genregion erhalten. Die neue stromaufwärts der in SEQ ID No. 1 dargestellten poxB-Genregion ist in SEQ ID No. 6 dargestellt. Die neue stromabwärts der in SEQ ID No. 1 dargestellten poxB-Genregion ist in SEQ ID No. 7 dargestellt.

25 4.2 Konstruktion eines Δ poxB-Allels

Für die Konstruktion des Δ poxB-Allels wurde die von Horton (Molecular Microbiology 3:93-99 (1995)) beschriebene Methode der GenSOEing-PCR angewendet. Hierfür wurden die in der Tabelle 1 angegebenen Primerpaare (Siehe auch SEQ ID

30 No. 8 bis 11) konstruiert. Mittels einer PCR wurde mit dem Primerpaar 1 der 5'-Bereich vor dem poxB-Gen und mit dem Primerpaar 2 der 3'-Bereich hinter dem poxB-Gens amplifiziert. Eine weitere PCR wurden dann mit den beiden

Amplifikaten und den Primern pox-del1 und pox-del4 durchgeführt, wodurch mittels GenSOEing die beiden Amplifikate verbunden wurden. Das so erhaltene Deletionsfragment bzw. Δ poxB-Allel enthält die flankierenden Sequenzen des poxB-Gens. Die Nukleotidsequenz des Δ poxB-Allels ist in SEQ ID No. 12 angegeben.

Tabelle 1

Primer	5'-Sequenz-3'	Primerpaar
pox-del1	ATGAGGAACATCCGGCGGTG	1
pox-del2	GAGAACAGCAGGAGTATCAATCATCACTGAACT CCTCAACGTTATGGC	
pox-del3	TGATGATTGATACACCTGCTGTTCTC	2
pox-del4	TCATTGCCACCTGCTTCTCA	

4.3 Konstruktion eines Austauschvektors

Das so erhaltene DNA Fragment wurde mit dem Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K2800-20) in den Vektor pCR-Blunt II-TOPO Vektor (Shuman et al., (1994) Journal of Biological Chemistry 269:32678-32684; Bernard et al., (1983) Journal of Molecular Biology 234:534-541) ligiert. Anschließend wurde der E. coli Stamm Top10 (Grant et al. (1990) Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 87:4645-4649) mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 50 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen

isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pCRB1-poxBdel (Figur 2) genannt.

- 5 Aus diesem Plasmid wurde das Δ poxB-Allel tragende Insert mittels EcoRI herausgespalten, aus dem Gel isoliert und in den ebenfalls EcoRI-gespaltenen, nicht-replikativen Integrationsvektor pK18mobsacB (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)) ligiert. Die Klonierungen wurden in E. coli
- 10 DH5 α mcr (Grant et al., (1990) Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 87: 4645-4649) als Wirt durchgeführt. Das resultierende Plasmid wurde als pK18mobsacB-poxBdel bezeichnet.

Beispiel 5

- 15 Mutagenese des poxB-Gens in dem Stamm FERM BP-1763

In der Patentschrift US-A-5,188,948 ist der L-Valin produzierende Stamm Brevibacterium lactofermentum FERM BP-1763 beschrieben.

- Für die Deletion des poxB-Gens wurde das
- 20 Integrationsplasmid pK18mobsacB-poxBdel in den Stamm FERM BP-1763 elektroporiert. Nach Selektion auf Kanamycin (25 μ g/ml) wurden Einzelklone erhalten, bei denen der Inaktivierungsvektor im Genom integriert vorlag. Um die Excision des Vektors zu ermöglichen wurden Einzelkolonien
- 25 in 50 ml flüssigem LB-Medium ohne Antibiotika 24 Stunden bei 30°C und 130 rpm inkubiert und dann auf Saccharosehaltigen Agarplatten (LB mit 15 g/l Agar und 10% Saccharose) ausgestrichen. Durch diese Selektion wurden Klone erhalten, die den Vektoranteil durch ein zweites
- 30 Rekombinationsereignis wieder verloren hatten (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology 174:5462-5465). Um solche Klone zu identifizieren, die das Δ poxB-Allel trugen, wurde eine Polymerase Kettenreaktion mit den Primern pox-dell und

pox-del4 (Tabelle 1 und SEQ ID No. 8 und 11) durchgeführt. Diese Primer amplifizieren auf Gesamt-DNA des Ausgangsstamms Stamm FERM BP-1763 ein ca. 3150 bp großes Fragment, während die Primer auf der DNA von poxB-
5 Deletionsmutanten ein verkürztes, 1422 bp großes Fragment amplifizierten. Einer so identifizierten Deletionsmutante fehlt folglich ein 1,7 kb großer Bereich des poxB-Gens.

Ein auf diese Weise hergestellter und geprüfter Stamm wurde als FERM BP-1763 Δ poxB bezeichnet und für die weiteren
10 Untersuchungen eingesetzt.

Beispiel 6

Herstellung von Pantothensäure

6.1 Herstellung der Stämme

Aus der EP-A-1006192 ist das Plasmid pND-DBC2 bekannt,
15 welches die Gene panB, panC und panD von Corynebacterium glutamicum trägt. Das Plasmid ist in Form des Stammes ATCC13032/pND-DBC2 als DSM 12437 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt.

20 Durch Transformation der Stämme FERM BP-1763 und FERM BP-1763 Δ poxB mit dem Plasmid pND-DBC2 entstanden die Pantothensäure produzierenden Stämme FERM BP-1763/pND-DBC2 und FERM BP-1763 Δ poxB.

6.2 Herstellung von Pantothensäure

25 Jeweils eine Probe der Stämme Brevibacterium lactofermentum FERM BP-1763/pND-DBC2 und FERM BP-1763 Δ poxB/pND-DBC2 wurde auf HHK-Agar ausgestrichen.

HHK-Agar besteht aus Hirn-Herz-Agar, der von der Firma Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen und mit
30 Kanamycin supplementiert wurde. Die Zusammensetzung des HHK-Agars ist in Tabelle 2 angegeben.

Diese Agarplatten-Kultur wurde 17 Stunden bei 37°C inkubiert und dann im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt. Ausgewählte Einzelkolonien wurden anschließend auf dem gleichen Medium weiter vermehrt. Mit einer Impföse wurde
5 Zellmaterial eines Klons vom HHK-Agar abgenommen und in 100 mL HHK-Bouillion übertragen, die in einem Schüttelkolben von 1000 mL Gesamtvolumen enthalten waren.

HHK-Bouillion besteht aus Hirn-Herz-Medium, das von der Firma Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen und mit
10 Glucose und Kanamycin supplementiert wurde. Die Zusammensetzung der HHK-Bouillion ist in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 2

HHK-Agar

Substanz	Menge pro Liter
Hirn-Herz-Agar	52,0 g
Kanamycin	25 mg

15

Tabelle 3

HHK-Bouillion

Substanz	Menge pro Liter
Hirn-Herz-Medium	37,0 g
Kanamycin	25 mg
Glucose	20,0 g

Die Ansätze wurde bei 30°C und 150 rpm für 22 Stunden
20 inkubiert. Nach Ende der Kultivierung wurde im Photometer

bei einer Wellenlänge von 660 nm (OD 660) eine optische Dichte von jeweils ca. 6 gemessen. Diese Kultur des Stammes wurden zur Beimpfung des Produktionsfermenters verwendet.

- 5 Zur Fermentation wurde das in Tabelle 4 angegebene Medium SK-71 verwendet. Alle Komponenten des SK-71-Mediums wurden direkt entsprechend der Arbeitskonzentrationen im Fermenter vorgelegt und in situ sterilisiert.

Tabelle 4

Medium SK-71

Verbindung	Menge pro Liter
Glucose Hydrat	110,0000g
Cornsteep Liquor (CSL)	5,0000g
β -Alanin	5,0000g
Nicotinsäure	0,0050g
l-Isoleucin	0,1500g
Homoserin	0,1500g
Ammoniumsulfat	25,0000g
K-dihydrogenphosphat	0,1000g
Mg-Sulfat $7H_2O$	1,0000g
Fe-Sulfat $7H_2O$	0,0100g
Mn-Sulfat H_2O	0,0050g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,0100g
Thiamin HCl	0,0002g
D(+)Biotin	0,0003g
Struktol	0,60g

Als Fermenter wurden 10 l Rührreaktoren der Firma B.Braun (BBI, Deutschland, Melsungen, Modell Biostat E/ED) verwendet.

5 Zur Inokulierung von 1950 g des Fermentationsmediums SK-71 wurden jeweils 100 mL der oben beschriebenen Schüttelkolbenvorkulturen in HHK-Bouillion eingesetzt.

10 Der Ansatz wurde über die gesamte Fermentationsdauer bei einer Temperatur von 30°C, einer volumenspezifischen Belüftung von 0,75 vvm, einer vom Sauerstoffverbrauch abhängigen Rührung von 800 - 1700 rpm und einem pH von 7,0 und einem Sauerstoffpartialdruck von 20% der Luftsättigung kultiviert. Die Kultur wurde insgesamt für ca. 49 Stunden unter den obengenannten Bedingungen bis zum Erreichen einer OD₆₆₀ von ca. 26 kultiviert. Als Korrekturmittel zur pH-
15 Wertregulierung wurde eine wässrige Ammoniak-Lösung (25 % w/v) verwendet.

Anschließend wurden die optische Dichte (OD) mit einem Digitalphotometer vom Typ LP1W der Firma Dr. Bruno Lange GmbH (Berlin, Deutschland) bei einer Meßwellenlänge von 660
20 nm und die Konzentration an gebildeter D- Pantothensäure mittels HPLC (Hypersil APS 2 5 µm, 250x5 mm, RI-Detektion) bestimmt.

In der Endprobe (ca. 49 Stunden) der Fermentationskultur des Stammes FERM BP-1763/pND-DBC2 wurde eine D-
25 Pantothensäure Konzentration von ca. 0,20 g/l gemessen. Die Pantothensäure Konzentration in der entsprechenden Probe des Stammes FERM BP-1763ΔpoxB/pND-DBC2 betrug ca. 0,23 g/l.

Folgende Figuren sind beigelegt:

- Figur 1: Karte des Plasmides pCR2.1poxBint
- 30 • Figur 2: Karte des Plasmides pCRB1-poxBdel

Bei der Angabe der Basenpaarzahlen handelt es sich um ca.-Werte, die im Rahmen der Reproduzierbarkeit erhalten werden.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben
5 folgende Bedeutung:

Figur 1:

ApR	Ampicillin-Resistenzgen
ColE1 ori	Replikationsursprung ColE1
f1-ori	Replikationsursprung des Phagen f1
KmR	Kanamycin-Resistenzgen
lacZ	Reste des lacZ α -Genfragmentes
poxBint	internes Fragment des poxB-Gens

Figur 2:

'lacZa	3'-Ende des lacZ α -Genfragmentes
3'-Region	3'-Flanke des poxB-Gens
5'-Region	5'-Flanke des poxB-Gens
ccdB	ccdB-Gen
Km	Kanamycin-Resistenzgen
lacZa'	5'-Ende des lacZ α -Genfragmentes
plac	Promotor des lac-Operons
pMB1	Replikationsursprung des Plasmids pMB1
Zeocin	Zeocin-Resistenzgen

Darüberhinaus wurden folgende Abkürzungen verwendet:

BamHI: Schnittstelle des Restriktionsenzymys BamHI

ClaI Schnittstelle des Restriktionsenzymys ClaI

EcoRI: Schnittstelle des Restriktionsenzymys EcoRI

HindIII: Schnittstelle des Restriktionsenzymys HindIII

SalI: Schnittstelle des Restriktionsenzymys SalI

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Verfahren zur fermentativen Herstellung von
D-Pantothensäure unter Verwendung coryneformer
Bakterien.

10 <130> 000439 BT

<140>
<141>

<160> 12

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 2160
20 <212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> CDS
25 <222> (327)..(2063)

<220>
<221> -35_signal
<222> (227)..(232)

30 <220>
<221> -10_signal
<222> (256)..(261)

35 <400> 1
ttagaggcga ttctgtgagg tcactttttg tgggggtcggg gtctaaattt ggccagtttt 60
cgaggcgacc agacaggcgt gcccacgatg tttaaataagg cgatcgggtg gcatctgtgt 120
40 ttggttttga cgggctgaaa ccaaaccaga ctgcccagca acgacggaaa tcccaaaagt 180
gggcatccct gtttggtacc gagtaccac ccgggcctga aactccctgg caggcgggcg 240
aagcgtggca acaactggaa ttaagagca caattgaagt cgcaccaagt taggcaacac 300
45 aatagccata acgttgagga gttcag atg gca cac agc tac gca gaa caa tta 353
Met Ala His Ser Tyr Ala Glu Gln Leu
1 5

50 att gac act ttg gaa gct caa ggt gtg aag cga att tat ggt ttg gtg 401
Ile Asp Thr Leu Glu Ala Gln Gly Val Lys Arg Ile Tyr Gly Leu Val
10 15 20 25

55 ggt gac agc ctt aat ccg atc gtg gat gct gtc cgc caa tca gat att 449
Gly Asp Ser Leu Asn Pro Ile Val Asp Ala Val Arg Gln Ser Asp Ile
30 35 40

	gag tgg gtg cac gtt cga aat gag gaa gcg gcg gcg ttt gca gcc ggt	497
	Glu Trp Val His Val Arg Asn Glu Glu Ala Ala Ala Phe Ala Ala Gly	
	45 50 55	
5	gcg gaa tcg ttg atc act ggg gag ctg gca gta tgt gct gct tct tgt	545
	Ala Glu Ser Leu Ile Thr Gly Glu Leu Ala Val Cys Ala Ala Ser Cys	
	60 65 70	
10	ggc cct gga aac aca cac ctg att cag ggt ctt tat gat tcg cat cga	593
	Gly Pro Gly Asn Thr His Leu Ile Gln Gly Leu Tyr Asp Ser His Arg	
	75 80 85	
15	aat ggt gcg aag gtg ttg gcc atc gct agc cat att ccg agt gcc cag	641
	Asn Gly Ala Lys Val Leu Ala Ile Ala Ser His Ile Pro Ser Ala Gln	
	90 95 100 105	
20	att ggt tcg acg ttc ttc cag gaa acg cat ccg gag att ttg ttt aag	689
	Ile Gly Ser Thr Phe Phe Gln Glu Thr His Pro Glu Ile Leu Phe Lys	
	110 115 120	
25	gaa tgc tct ggt tac tgc gag atg gtg aat ggt ggt gag cag ggt gaa	737
	Glu Cys Ser Gly Tyr Cys Glu Met Val Asn Gly Gly Glu Gln Gly Glu	
	125 130 135	
30	cgc att ttg cat cac gcg att cag tcc acc atg gcg ggt aaa ggt gtg	785
	Arg Ile Leu His His Ala Ile Gln Ser Thr Met Ala Gly Lys Gly Val	
	140 145 150	
35	tcg gtg gta gtg att cct ggt gat atc gct aag gaa gac gca ggt gac	833
	Ser Val Val Val Ile Pro Gly Asp Ile Ala Lys Glu Asp Ala Gly Asp	
	155 160 165	
40	ggc act tat tcc aat tcc act att tct tct ggc act cct gtg gtg ttc	881
	Gly Thr Tyr Ser Asn Ser Thr Ile Ser Ser Gly Thr Pro Val Val Phe	
	170 175 180 185	
45	ccg gat cct act gag gct gca gcg ctg gtg gag gcg att aac aac gct	929
	Pro Asp Pro Thr Glu Ala Ala Ala Leu Val Glu Ala Ile Asn Asn Ala	
	190 195 200	
50	aag tct gtc act ttg ttc tgc ggt gcg ggc gtg aag aat gct cgc gcg	977
	Lys Ser Val Thr Leu Phe Cys Gly Ala Gly Val Lys Asn Ala Arg Ala	
	205 210 215	
55	cag gtg ttg gag ttg gcg gag aag att aaa tca ccg atc ggg cat gcg	1025
	Gln Val Leu Glu Leu Ala Glu Lys Ile Lys Ser Pro Ile Gly His Ala	
	220 225 230	
60	ctg ggt ggt aag cag tac atc cag cat gag aat ccg ttt gag gtc ggc	1073
	Leu Gly Gly Lys Gln Tyr Ile Gln His Glu Asn Pro Phe Glu Val Gly	
	235 240 245	
65	atg tct ggc ctg ctt ggt tac ggc gcc tgc gtg gat gcg tcc aat gag	1121
	Met Ser Gly Leu Leu Gly Tyr Gly Ala Cys Val Asp Ala Ser Asn Glu	
	250 255 260 265	
70	gcg gat ctg ctg att cta ttg ggt acg gat ttc cct tat tct gat ttc	1169
	Ala Asp Leu Leu Ile Leu Leu Gly Thr Asp Phe Pro Tyr Ser Asp Phe	
	270 275 280	

	ctt cct aaa gac aac gtt gcc cag gtg gat atc aac ggt gcg cac att	1217
	Leu Pro Lys Asp Asn Val Ala Gln Val Asp Ile Asn Gly Ala His Ile	
	285 290 295	
5	ggt cga cgt acc acg gtg aag tat ccg gtg acc ggt gat gtt gct gca	1265
	Gly Arg Arg Thr Thr Val Lys Tyr Pro Val Thr Gly Asp Val Ala Ala	
	300 305 310	
10	aca atc gaa aat att ttg cct cat gtg aag gaa aaa aca gat cgt tcc	1313
	Thr Ile Glu Asn Ile Leu Pro His Val Lys Glu Lys Thr Asp Arg Ser	
	315 320 325	
15	ttc ctt gat cgg atg ctc aag gca cac gag cgt aag ttg agc tcg gtg	1361
	Phe Leu Asp Arg Met Leu Lys Ala His Glu Arg Lys Leu Ser Ser Val	
	330 335 340 345	
20	gta gag acg tac aca cat aac gtc gag aag cat gtg cct att cac cct	1409
	Val Glu Thr Tyr Thr His Asn Val Glu Lys His Val Pro Ile His Pro	
	350 355 360	
	gaa tac gtt gcc tct att ttg aac gag ctg gcg gat aag gat gcg gtg	1457
	Glu Tyr Val Ala Ser Ile Leu Asn Glu Leu Ala Asp Lys Asp Ala Val	
	365 370 375	
25	ttt act gtg gat acc ggc atg tgc aat gtg tgg cat gcg agg tac atc	1505
	Phe Thr Val Asp Thr Gly Met Cys Asn Val Trp His Ala Arg Tyr Ile	
	380 385 390	
30	gag aat ccg gag gga acg cgc gac ttt gtg ggt tca ttc cgc cac ggc	1553
	Glu Asn Pro Glu Gly Thr Arg Asp Phe Val Gly Ser Phe Arg His Gly	
	395 400 405	
35	acg atg gct aat gcg ttg cct cat gcg att ggt gcg caa agt gtt gat	1601
	Thr Met Ala Asn Ala Leu Pro His Ala Ile Gly Ala Gln Ser Val Asp	
	410 415 420 425	
40	cga aac cgc cag gtg atc gcg atg tgt ggc gat ggt ggt ttg ggc atg	1649
	Arg Asn Arg Gln Val Ile Ala Met Cys Gly Asp Gly Gly Leu Gly Met	
	430 435 440	
	ctg ctg ggt gag ctt ctg acc gtt aag ctg cac caa ctt ccg ctg aag	1697
	Leu Leu Gly Glu Leu Leu Thr Val Lys Leu His Gln Leu Pro Leu Lys	
	445 450 455	
45	gct gtg gtg ttt aac aac agt tct ttg ggc atg gtg aag ttg gag atg	1745
	Ala Val Val Phe Asn Asn Ser Ser Leu Gly Met Val Lys Leu Glu Met	
	460 465 470	
50	ctc gtg gag gga cag cca gaa ttt ggt act gac cat gag gaa gtg aat	1793
	Leu Val Glu Gly Gln Pro Glu Phe Gly Thr Asp His Glu Glu Val Asn	
	475 480 485	
55	ttc gca gag att gcg gcg gct gcg ggt atc aaa tcg gta cgc atc acc	1841
	Phe Ala Glu Ile Ala Ala Ala Gly Ile Lys Ser Val Arg Ile Thr	
	490 495 500 505	
	gat ccg aag aaa gtt cgc gag cag cta gct gag gca ttg gca tat cct	1889
	Asp Pro Lys Lys Val Arg Glu Gln Leu Ala Glu Ala Leu Ala Tyr Pro	
	510 515 520	

	gga cct gta ctg atc gat atc gtc acg gat cct aat gcg ctg tcg atc	1937
	Gly Pro Val Leu Ile Asp Ile Val Thr Asp Pro Asn Ala Leu Ser Ile	
	525 530 535	
5	cca cca acc atc acg tgg gaa cag gtc atg gga ttc agc aag gcg gcc	1985
	Pro Pro Thr Ile Thr Trp Glu Gln Val Met Gly Phe Ser Lys Ala Ala	
	540 545 550	
10	acc cga acc gtc ttt ggt gga gga gta gga gcg atg atc gat ctg gcc	2033
	Thr Arg Thr Val Phe Gly Gly Gly Val Gly Ala Met Ile Asp Leu Ala	
	555 560 565	
15	cgt tcg aac ata agg aat att cct act cca tgatgattga tacacctgct	2083
	Arg Ser Asn Ile Arg Asn Ile Pro Thr Pro	
	570 575	
	gtttctcattg accgcgagcg cttaactgcc aacatttcca ggatggcagc tcacgccggt	2143
20	gccccatgaga ttgccct	2160
	<210> 2	
	<211> 579	
25	<212> PRT	
	<213> Corynebacterium glutamicum	
	<400> 2	
30	Met Ala His Ser Tyr Ala Glu Gln Leu Ile Asp Thr Leu Glu Ala Gln	
	1 5 10 15	
	Gly Val Lys Arg Ile Tyr Gly Leu Val Gly Asp Ser Leu Asn Pro Ile	
	20 25 30	
35	Val Asp Ala Val Arg Gln Ser Asp Ile Glu Trp Val His Val Arg Asn	
	35 40 45	
	Glu Glu Ala Ala Ala Phe Ala Ala Gly Ala Glu Ser Leu Ile Thr Gly	
40	50 55 60	
	Glu Leu Ala Val Cys Ala Ala Ser Cys Gly Pro Gly Asn Thr His Leu	
	65 70 75 80	
45	Ile Gln Gly Leu Tyr Asp Ser His Arg Asn Gly Ala Lys Val Leu Ala	
	85 90 95	
	Ile Ala Ser His Ile Pro Ser Ala Gln Ile Gly Ser Thr Phe Phe Gln	
	100 105 110	
50	Glu Thr His Pro Glu Ile Leu Phe Lys Glu Cys Ser Gly Tyr Cys Glu	
	115 120 125	
	Met Val Asn Gly Gly Glu Gln Gly Glu Arg Ile Leu His His Ala Ile	
55	130 135 140	
	Gln Ser Thr Met Ala Gly Lys Gly Val Ser Val Val Val Ile Pro Gly	
	145 150 155 160	

	Asp	Ile	Ala	Lys	Glu	Asp	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Thr	
					165					170					175		
5	Ile	Ser	Ser	Gly	Thr	Pro	Val	Val	Phe	Pro	Asp	Pro	Thr	Glu	Ala	Ala	
				180					185					190			
	Ala	Leu	Val	Glu	Ala	Ile	Asn	Asn	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Cys	
			195					200					205				
10	Gly	Ala	Gly	Val	Lys	Asn	Ala	Arg	Ala	Gln	Val	Leu	Glu	Leu	Ala	Glu	
		210					215					220					
	Lys	Ile	Lys	Ser	Pro	Ile	Gly	His	Ala	Leu	Gly	Gly	Lys	Gln	Tyr	Ile	
15		225				230					235					240	
	Gln	His	Glu	Asn	Pro	Phe	Glu	Val	Gly	Met	Ser	Gly	Leu	Leu	Gly	Tyr	
					245					250					255		
20	Gly	Ala	Cys	Val	Asp	Ala	Ser	Asn	Glu	Ala	Asp	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	
				260					265					270			
	Gly	Thr	Asp	Phe	Pro	Tyr	Ser	Asp	Phe	Leu	Pro	Lys	Asp	Asn	Val	Ala	
			275					280					285				
25	Gln	Val	Asp	Ile	Asn	Gly	Ala	His	Ile	Gly	Arg	Arg	Thr	Thr	Val	Lys	
		290					295					300					
	Tyr	Pro	Val	Thr	Gly	Asp	Val	Ala	Ala	Thr	Ile	Glu	Asn	Ile	Leu	Pro	
30		305				310					315					320	
	His	Val	Lys	Glu	Lys	Thr	Asp	Arg	Ser	Phe	Leu	Asp	Arg	Met	Leu	Lys	
					325					330					335		
35	Ala	His	Glu	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Glu	Thr	Tyr	Thr	His	Asn	
				340					345					350			
	Val	Glu	Lys	His	Val	Pro	Ile	His	Pro	Glu	Tyr	Val	Ala	Ser	Ile	Leu	
			355					360					365				
40	Asn	Glu	Leu	Ala	Asp	Lys	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Val	Asp	Thr	Gly	Met	
		370					375					380					
	Cys	Asn	Val	Trp	His	Ala	Arg	Tyr	Ile	Glu	Asn	Pro	Glu	Gly	Thr	Arg	
45		385				390					395					400	
	Asp	Phe	Val	Gly	Ser	Phe	Arg	His	Gly	Thr	Met	Ala	Asn	Ala	Leu	Pro	
					405					410					415		
50	His	Ala	Ile	Gly	Ala	Gln	Ser	Val	Asp	Arg	Asn	Arg	Gln	Val	Ile	Ala	
				420					425					430			
	Met	Cys	Gly	Asp	Gly	Gly	Leu	Gly	Met	Leu	Leu	Gly	Glu	Leu	Leu	Thr	
			435					440					445				
55	Val	Lys	Leu	His	Gln	Leu	Pro	Leu	Lys	Ala	Val	Val	Phe	Asn	Asn	Ser	
		450					455					460					
	Ser	Leu	Gly	Met	Val	Lys	Leu	Glu	Met	Leu	Val	Glu	Gly	Gln	Pro	Glu	
						470					475					480	

Phe Gly Thr Asp His Glu Glu Val Asn Phe Ala Glu Ile Ala Ala Ala
 485 490 495
 5 Ala Gly Ile Lys Ser Val Arg Ile Thr Asp Pro Lys Lys Val Arg Glu
 500 505 510
 Gln Leu Ala Glu Ala Leu Ala Tyr Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Ile
 515 520 525
 10 Val Thr Asp Pro Asn Ala Leu Ser Ile Pro Pro Thr Ile Thr Trp Glu
 530 535 540
 15 Gln Val Met Gly Phe Ser Lys Ala Ala Thr Arg Thr Val Phe Gly Gly
 545 550 555 560
 Gly Val Gly Ala Met Ile Asp Leu Ala Arg Ser Asn Ile Arg Asn Ile
 565 570 575
 20 Pro Thr Pro

25 <210> 3
 <211> 875
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

30 <400> 3
 tgcgagatgg tgaatggtgg tgagcagggt gaacgcattt tgcatacgc gattcagtc 60
 accatggcgg gtaaagggtg gtcggtggta gtgattcctg gtgatatcg taaggaagac 120
 gcaggtgacg gtacttattc caattccact atttcttctg gcaactcctgt ggtgttccc 180
 gatcctactg aggctgcagc gctggtggag gcgattaaca acgctaagtc tgtcactttg 240
 35 ttctgcggtg cgggcgtgaa gaatgctcgc gcgcagggtg tggagttggc ggagaagatt 300
 aaatcaccga tcgggcatgc gctgggtggt aagcagtaca tccagcatga gaatccgttt 360
 gaggtcggca tgtctggcct gcttggttac ggcgcctgcg tggatgcgc caatgaggcg 420
 gatctgctga ttctattggg tacggatttc cttatttctg atttccttcc taaagacaac 480
 gttgcccagg tggatatcaa cggtgcgcac attggtcgac gtaccacggt gaagtatccg 540
 40 gtgaccggtg atgttgctgc aacaatcgaa aatattttgc ctcatgtgaa ggaaaaaaca 600
 gatcgttcc tccctgacg gatgctcaag gcacacgagc gtaagttgag ctcggtggtg 660
 gagacgtaca cacataacgt cgagaagcat gtgcctattc accctgaata cgttgccctc 720
 attttgaacg agctggcgga taaggatgcg gtgtttactg tggataccgg catgtgcaat 780
 gtgtggcatg cgaggtacat cgagaatccg gagggaacgc gcgactttgt gggttcattc 840
 45 cgccacggca cgatggctaa tgcgttgccct catgc 875

50 <210> 4
 <211> 3248
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

55 <220>
 <221> CDS
 <222> (802)..(2538)

<400> 4
 gctctcgcag caacaagagc ccacgcagtt ggagcaaacg cagcaccaag tgaagcgatt 60

	ccgaaaaatgc tcaagcccat gaggaacatc cggcggttggc cgattttgtc acccaaagtg	120
	ccggtaccca aaagaaggcc cgccatgagc aggggatatg cgttgatgat ccacaacgct	180
5	tgggttttcgg tggctgcgag ctgttcacgc agcagaggga gtgcggtgta gagaatcgag	240
	ttgtctacac cgatcagaaa gagaccaccg ctgataacgg cgaggaaagc ccaacgttgg	300
10	gttttcgtag gcgcttgcg cgtgaagggt tctgaagtca tggatcgtaa ctgtaacgaa	360
	tggtcggtac agttacaact cttttgttgg tgttttagac cacggcgctg tgtggcgatt	420
	taagacgtcg gaaatcgtag gggactgtca gcgtgggtcg ggttctttga ggcgcttaga	480
15	ggcgattctg tgaggtcact ttttgtgggg tcgggggtcta aatttggcca gttttcgagg	540
	cgaccagaca ggcgtgccca cgatgtttaa ataggcgatc ggtgggcatc tgtgtttggg	600
20	ttcgacgggc tgaaacccaa ccagactgcc cagcaacgac ggaaatccca aaagtgggca	660
	tccctgtttg gtaccgagta cccaccggg cctgaaactc cctggcaggc gggcgaagcg	720
	tggcaacaac tggaatttaa gagcacaatt gaagtcgcac caagttaggc aacacaatag	780
25	ccataacggt gaggagttca g atg gca cac agc tac gca gaa caa tta att	831
	Met Ala His Ser Tyr Ala Glu Gln Leu Ile	10
	1 5	
30	gac act ttg gaa gct caa ggt gtg aag cga att tat ggt ttg gtg ggt	879
	Asp Thr Leu Glu Ala Gln Gly Val Lys Arg Ile Tyr Gly Leu Val Gly	25
	15 20	
	gac agc ctt aat ccg atc gtg gat gct gtc cgc caa tca gat att gag	927
35	Asp Ser Leu Asn Pro Ile Val Asp Ala Val Arg Gln Ser Asp Ile Glu	40
	30 35	
	tgg gtg cac gtt cga aat gag gaa gcg gcg gcg ttt gca gcc ggt gcg	975
	Trp Val His Val Arg Asn Glu Glu Ala Ala Ala Phe Ala Ala Gly Ala	55
	45 50	
40	gaa tcg ttg atc act ggg gag ctg gca gta tgt gct gct tct tgt ggt	1023
	Glu Ser Leu Ile Thr Gly Glu Leu Ala Val Cys Ala Ala Ser Cys Gly	70
	60 65	
45	cct gga aac aca cac ctg att cag ggt ctt tat gat tcg cat cga aat	1071
	Pro Gly Asn Thr His Leu Ile Gln Gly Leu Tyr Asp Ser His Arg Asn	90
	75 80 85	
50	ggt gcg aag gtg ttg gcc atc gct agc cat att ccg agt gcc cag att	1119
	Gly Ala Lys Val Leu Ala Ile Ala Ser His Ile Pro Ser Ala Gln Ile	105
	95 100	
	ggt tcg acg ttc ttc cag gaa acg cat ccg gag att ttg ttt aag gaa	1167
55	Gly Ser Thr Phe Phe Gln Glu Thr His Pro Glu Ile Leu Phe Lys Glu	120
	110 115	
	tgc tct ggt tac tgc gag atg gtg aat ggt ggt gag cag ggt gaa cgc	1215
	Cys Ser Gly Tyr Cys Glu Met Val Asn Gly Gly Glu Gln Gly Glu Arg	135
	125 130	

	att ttg cat cac gcg att cag tcc acc atg gcg ggt aaa ggt gtg tcg	1263
	Ile Leu His His Ala Ile Gln Ser Thr Met Ala Gly Lys Gly Val Ser	
	140 145 150	
5	gtg gta gtg att cct ggt gat atc gct aag gaa gac gca ggt gac ggt	1311
	Val Val Val Ile Pro Gly Asp Ile Ala Lys Glu Asp Ala Gly Asp Gly	
	155 160 165 170	
10	act tat tcc aat tcc act att tct tct ggc act cct gtg gtg ttc ccg	1359
	Thr Tyr Ser Asn Ser Thr Ile Ser Ser Gly Thr Pro Val Val Phe Pro	
	175 180 185	
15	gat cct act gag gct gca gcg ctg gtg gag gcg att aac aac gct aag	1407
	Asp Pro Thr Glu Ala Ala Ala Leu Val Glu Ala Ile Asn Asn Ala Lys	
	190 195 200	
20	tct gtc act ttg ttc tgc ggt gcg ggc gtg aag aat gct cgc gcg cag	1455
	Ser Val Thr Leu Phe Cys Gly Ala Gly Val Lys Asn Ala Arg Ala Gln	
	205 210 215	
25	gtg ttg gag ttg gcg gag aag att aaa tca ccg atc ggg cat gcg ctg	1503
	Val Leu Glu Leu Ala Glu Lys Ile Lys Ser Pro Ile Gly His Ala Leu	
	220 225 230	
30	ggt ggt aag cag tac atc cag cat gag aat ccg ttt gag gtc ggc atg	1551
	Gly Gly Lys Gln Tyr Ile Gln His Glu Asn Pro Phe Glu Val Gly Met	
	235 240 245 250	
35	tct ggc ctg ctt ggt tac ggc gcc tgc gtg gat gcg tcc aat gag gcg	1599
	Ser Gly Leu Leu Gly Tyr Gly Ala Cys Val Asp Ala Ser Asn Glu Ala	
	255 260 265	
40	gat ctg ctg att cta ttg ggt acg gat ttc cct tat tct gat ttc ctt	1647
	Asp Leu Leu Ile Leu Leu Gly Thr Asp Phe Pro Tyr Ser Asp Phe Leu	
	270 275 280	
45	cct aaa gac aac gtt gcc cag gtg gat atc aac ggt gcg cac att ggt	1695
	Pro Lys Asp Asn Val Ala Gln Val Asp Ile Asn Gly Ala His Ile Gly	
	285 290 295	
50	cga cgt acc acg gtg aag tat ccg gtg acc ggt gat gtt gct gca aca	1743
	Arg Arg Thr Thr Val Lys Tyr Pro Val Thr Gly Asp Val Ala Ala Thr	
	300 305 310	
55	atc gaa aat att ttg cct cat gtg aag gaa aaa aca gat cgt tcc ttc	1791
	Ile Glu Asn Ile Leu Pro His Val Lys Glu Lys Thr Asp Arg Ser Phe	
	315 320 325 330	
60	ctt gat cgg atg ctc aag gca cac gag cgt aag ttg agc tcg gtg gta	1839
	Leu Asp Arg Met Leu Lys Ala His Glu Arg Lys Leu Ser Ser Val Val	
	335 340 345	
65	gag acg tac aca cat aac gtc gag aag cat gtg cct att cac cct gaa	1887
	Glu Thr Tyr Thr His Asn Val Glu Lys His Val Pro Ile His Pro Glu	
	350 355 360	
70	tac gtt gcc tct att ttg aac gag ctg gcg gat aag gat gcg gtg ttt	1935
	Tyr Val Ala Ser Ile Leu Asn Glu Leu Ala Asp Lys Asp Ala Val Phe	
	365 370 375	

tttgccggcg caggttttac ggacatcttt attgcatatc cgctgtatct aaccgatcat 2798
 5 gcagtgaac gcctgaacgc gatccccgga gaaatttcca ttggcgtgga ttcggtagag 2858
 atggcacagg cgacggcggg tttgcgggaa gatataagg ctctgattga agtggattcg 2918
 ggacatcgta gaagtggagt cacggcgact gcttcagaat tgagtcagat ccgcgaggcg 2978
 10 ctgggcagca ggtatgcagg agtgtttact tttcctgggc attcttatgg cccgggaaat 3038
 ggtgagcagg cagcagctga tgagcttcag gctctaaaca acagcgtcca gcgacttgct 3098
 15 ggccggcctga cttctggcgg ttcctcgccg tctgcgcagt ttacagacgc aatcgatgag 3158
 atgcgaccag gcgtgtatgt gtttaacgat tcccagcaga tcacctcggg agcatgcact 3218
 gagaagcagg tggcaatgac ggtgctgtct 3248
 20
 <210> 5
 <211> 579
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 25
 <400> 5
 Met Ala His Ser Tyr Ala Glu Gln Leu Ile Asp Thr Leu Glu Ala Gln
 1 5 10 15
 30 Gly Val Lys Arg Ile Tyr Gly Leu Val Gly Asp Ser Leu Asn Pro Ile
 20 25 30
 Val Asp Ala Val Arg Gln Ser Asp Ile Glu Trp Val His Val Arg Asn
 35 35 40 45
 35 Glu Glu Ala Ala Ala Phe Ala Ala Gly Ala Glu Ser Leu Ile Thr Gly
 50 55 60
 40 Glu Leu Ala Val Cys Ala Ala Ser Cys Gly Pro Gly Asn Thr His Leu
 65 70 75 80
 Ile Gln Gly Leu Tyr Asp Ser His Arg Asn Gly Ala Lys Val Leu Ala
 85 90 95
 45 Ile Ala Ser His Ile Pro Ser Ala Gln Ile Gly Ser Thr Phe Phe Gln
 100 105 110
 Glu Thr His Pro Glu Ile Leu Phe Lys Glu Cys Ser Gly Tyr Cys Glu
 115 120 125
 50 Met Val Asn Gly Gly Glu Gln Gly Glu Arg Ile Leu His His Ala Ile
 130 135 140
 55 Gln Ser Thr Met Ala Gly Lys Gly Val Ser Val Val Val Ile Pro Gly
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Lys Glu Asp Ala Gly Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Ser Thr
 165 170 175

	Ile	Ser	Ser	Gly	Thr	Pro	Val	Val	Phe	Pro	Asp	Pro	Thr	Glu	Ala	Ala	
				180					185					190			
5	Ala	Leu	Val	Glu	Ala	Ile	Asn	Asn	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Cys	
			195					200					205				
	Gly	Ala	Gly	Val	Lys	Asn	Ala	Arg	Ala	Gln	Val	Leu	Glu	Leu	Ala	Glu	
		210					215					220					
10	Lys	Ile	Lys	Ser	Pro	Ile	Gly	His	Ala	Leu	Gly	Gly	Lys	Gln	Tyr	Ile	
	225					230					235					240	
	Gln	His	Glu	Asn	Pro	Phe	Glu	Val	Gly	Met	Ser	Gly	Leu	Leu	Gly	Tyr	
					245					250					255		
15	Gly	Ala	Cys	Val	Asp	Ala	Ser	Asn	Glu	Ala	Asp	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	
				260					265					270			
20	Gly	Thr	Asp	Phe	Pro	Tyr	Ser	Asp	Phe	Leu	Pro	Lys	Asp	Asn	Val	Ala	
			275					280					285				
	Gln	Val	Asp	Ile	Asn	Gly	Ala	His	Ile	Gly	Arg	Arg	Thr	Thr	Val	Lys	
		290					295					300					
25	Tyr	Pro	Val	Thr	Gly	Asp	Val	Ala	Ala	Thr	Ile	Glu	Asn	Ile	Leu	Pro	
	305					310					315					320	
	His	Val	Lys	Glu	Lys	Thr	Asp	Arg	Ser	Phe	Leu	Asp	Arg	Met	Leu	Lys	
					325					330					335		
30	Ala	His	Glu	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Glu	Thr	Tyr	Thr	His	Asn	
				340					345					350			
	Val	Glu	Lys	His	Val	Pro	Ile	His	Pro	Glu	Tyr	Val	Ala	Ser	Ile	Leu	
35			355					360					365				
	Asn	Glu	Leu	Ala	Asp	Lys	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Val	Asp	Thr	Gly	Met	
		370					375					380					
40	Cys	Asn	Val	Trp	His	Ala	Arg	Tyr	Ile	Glu	Asn	Pro	Glu	Gly	Thr	Arg	
	385					390					395					400	
	Asp	Phe	Val	Gly	Ser	Phe	Arg	His	Gly	Thr	Met	Ala	Asn	Ala	Leu	Pro	
					405					410					415		
45	His	Ala	Ile	Gly	Ala	Gln	Ser	Val	Asp	Arg	Asn	Arg	Gln	Val	Ile	Ala	
				420					425					430			
	Met	Cys	Gly	Asp	Gly	Gly	Leu	Gly	Met	Leu	Leu	Gly	Glu	Leu	Leu	Thr	
50			435					440					445				
	Val	Lys	Leu	His	Gln	Leu	Pro	Leu	Lys	Ala	Val	Val	Phe	Asn	Asn	Ser	
		450					455					460					
55	Ser	Leu	Gly	Met	Val	Lys	Leu	Glu	Met	Leu	Val	Glu	Gly	Gln	Pro	Glu	
	465					470					475					480	
	Phe	Gly	Thr	Asp	His	Glu	Glu	Val	Asn	Phe	Ala	Glu	Ile	Ala	Ala	Ala	
					485					490						495	

Ala Gly Ile Lys Ser Val Arg Ile Thr Asp Pro Lys Lys Val Arg Glu
500 505 510

5 Gln Leu Ala Glu Ala Leu Ala Tyr Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Ile
515 520 525

Val Thr Asp Pro Asn Ala Leu Ser Ile Pro Pro Thr Ile Thr Trp Glu
530 535 540

10 Gln Val Met Gly Phe Ser Lys Ala Ala Thr Arg Thr Val Phe Gly Gly
545 550 555 560

15 Gly Val Gly Ala Met Ile Asp Leu Ala Arg Ser Asn Ile Arg Asn Ile
565 570 575

Pro Thr Pro

20

<210> 6
<211> 475
<212> DNA
25 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 6
gctctcgcag caacaagagc ccacgcagtt ggagcaaacg cagcaccaag tgaagcgatt 60
ccgaaaatgc tcaagcccat gaggaacatc cggcggtggc cgattttgtc acccaaagt 120
30 ccggtaccca aaagaaggcc cgccatgagc aggggatatg cgttgatgat ccacaacgct 180
tggttttcgg tggctgcgag ctgttcacgc agcagaggga gtgcggtgta gagaatcgag 240
ttgtctacac cgatcagaaa gagaccaccg ctgataacgg cgaggaaagc ccaacgttgg 300
gttttcgtag gcgcttgccg ctgtaagggt tctgaagtca tggatcgtaa ctgtaacgaa 360
tggtcggtag agttacaact cttttgttgg tgttttagac cacggcgctg tgtggcgatt 420
35 taagacgtcg gaaatcgtag gggactgtca gcgtgggtcg gggtctttga ggcgc 475

<210> 7
40 <211> 613
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 7
gcgtccgcat gtgaaaacgc acaaaatcat tgaaattgcg cagatgcagg tcgacgccgg 60
45 tgcccagagg atcacctgcg caaccattgg cgaggcggaa atttttgccg gcgcagggtt 120
tacggacatc tttattgcat atccgctgta tctaaccgat catgcagtgc aacgcctgaa 180
cgcgatcccc ggagaaatth ccattggcgt ggattcggta gagatggcac aggcgacggc 240
gggtttgcgg gaagatatca aggctctgat tgaagtggat tcgggacatc gtagaagtgg 300
agtcacggcg actgcttcag aattgagtca gatccgcgag gcgctgggca gcaggatatgc 360
50 aggagtggtt acttttctct ggcattctta tggcccggga aatggtgagc aggcagcagc 420
tgatgagctt caggctctaa acaacagcgt ccagcgactt gctggcggcc tgacttctgg 480
cggttcctcg ccgtctgcgc agtttacaga cgcaatcgat gagatgcgac caggcgtgta 540
tgtgtttaac gattcccagc agatcacctc gggagcatgc actgagaagc aggtggcaat 600
55 gacggtgctg tct 613

<210> 8
<211> 20
<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

5 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
pox-del1

<400> 8
atgaggaaca tccggcggtg 20

10 <210> 9
<211> 48
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

15 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
pox-del2

20 <400> 9
gagaacagca ggagtatcaa tcatcactga actcctcaac gttatggc 48

25 <210> 10
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

30 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
pox-del3

35 <400> 10
tgatgattga tacacctgct gttctc 26

40 <210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

45 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
pox-del4

50 <400> 11
tcattgccac ctgcttctca 20

55 <210> 12
<211> 1422
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1422)

<223> Sequenz des delta poxB-Allels

<220>

<221> misc_feature

<222> (723)..(724)

<223> Deletion der Kodierregion des poxB-Gens

5

<400> 12

	atgaggaaca	tccggcgggtg	gccgattttg	tcacccaaag	tgccgggtacc	caaaagaagg	60
	cccgccatga	gcaggggata	tgcgttgatg	atccacaacg	cttgggtttc	ggtggctgcg	120
	agctgttcac	gcagcagagg	gagtgcggtg	tagagaatcg	agttgtctac	accgatcaga	180
10	aagagaccac	cgctgataac	ggcgaggaaa	gcccaacgtt	gggttttcgt	aggcgcttgc	240
	gcctgtaagg	tttctgaagt	catggatcgt	aactgtaacg	aatggtcggt	acagttacaa	300
	ctcttttgtt	gggtgttttag	accacggcgc	tgtgtggcga	tttaagacgt	cggaaatcgt	360
	aggggactgt	cagcgtgggt	cgggttcttt	gaggcgctta	gaggcgattc	tgtgaggtca	420
	ctttttgtgg	ggtcggggtc	taaatttggc	cagttttcga	ggcgaccaga	caggcgtgcc	480
15	cacgatgttt	aaataggcga	tcggtgggca	tctgtgtttg	gtttcgacgg	gctgaaacca	540
	aaccagactg	cccagcaacg	acggaaatcc	caaaagtggg	catccctgtt	tggtaccgag	600
	taccaccccg	ggcctgaaac	tccctggcag	gcggggcgaag	cgtggcaaca	actggaatth	660
	aagagcacia	ttgaagtcgc	accaagttag	gcaacacaat	agccataaag	ttgaggagtt	720
	cagtgatgat	tgatacacct	gctgtttctc	ttgaccgcga	gcgcttaact	gccaacattt	780
20	ccaggatggc	agctcacgcc	ggtgcccatg	agattgccct	gcgtccgcat	gtgaaaacgc	840
	acaaaatcat	tgaaattgcg	cagatgcagg	tcgacgccgg	tgcccagggg	atcacctgcg	900
	caaccattgg	cgaggcggaa	atttttgcgg	gcgcaggttt	tacggacatc	tttattgcat	960
	atccgctgta	tctaaccgat	catgcagtgc	aacgcctgaa	cgcgatcccc	ggagaaatth	1020
	ccattggcgt	ggattcggta	gagatggcac	aggcgacggc	gggtttgcgg	gaagatatca	1080
25	aggctctgat	tgaagtggat	tcgggacatc	gtagaagtgg	agtcacggcg	actgcttcag	1140
	aattgagtca	gatccgcgag	gcgctgggca	gcaggatatgc	aggagtgttt	acttttctctg	1200
	ggcattctta	tggcccggga	aatggtgagc	aggcagcagc	tgatgagctt	caggctctaa	1260
	acaacagcgt	ccagcgactt	gctggcggcc	tgacttctgg	cggttcctcg	ccgtctgcgc	1320
	agtttacaga	cgcaatcgat	gagatgcgac	caggcgtgta	tgtgtttaac	gattcccagc	1380
30	agatcacctc	gggagcatgc	actgagaagc	agggtggcaat	ga		1422

Patentansprüche

1. Verfahren zur fermentativen Herstellung von
D-Pantothensäure d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte
5 durchführt:
 - a) Fermentation der D-Pantothensäure produzierenden
coryneformen Bakterien, in denen zumindest die
für die Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierende
Nucleotidsequenz (poxB) abgeschwächt, insbesondere
10 ausgeschaltet wird;
 - b) Anreicherung der D-Pantothensäure im Medium oder in
den Zellen der Bakterien; und
 - c) Isolierung der produzierten D-Pantothensäure.
2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h
15 g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Erzielung der
Abschwächung das Verfahren der Insertion insbesondere
mittels des Vektors pCR2.1poxBint, dargestellt in Figur
1 und hinterlegt in E. coli als DSM 13114, verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h
20 g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Erzielung der
Abschwächung das Verfahren der Deletion insbesondere
mittels des Vektors pCRB1-poxBdel dargestellt in Figur
2, verwendet.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
25 g e k e n n z e i c h n e t, daß man coryneforme
Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere
Gene des Biosyntheseweges der D-Pantothensäure
verstärkt.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
30 g e k e n n z e i c h n e t, daß man coryneforme
Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege

zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der D-Pantothensäure verringern.

6. Verfahren gemäß Anspruch 3, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man coryneforme
5 Bakterien einsetzt, in denen man gleichzeitig das für die Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase kodierende panB-Gen verstärkt.
7. Verfahren gemäß Anspruch 3, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man coryneforme
10 Bakterien einsetzt, in denen man gleichzeitig das für die Pantothenat-Synthetase kodierende panC-Gen verstärkt.
8. Verfahren gemäß Anspruch 3, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man coryneforme
15 Bakterien einsetzt, in denen man gleichzeitig das für die Acetohydroxysäure Isomero-reduktase kodierende ilvC-Gen verstärkt.
9. Verfahren gemäß Anspruch 3, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man coryneforme
20 Bakterien einsetzt, in denen man gleichzeitig das für die Dihydroxysäure-Dehydratase kodierende ilvD-Gen verstärkt.
10. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 4, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man coryneforme
25 Bakterien einsetzt, in denen man gleichzeitig das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pck-Gen abschwächt.
11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 5 bis 8, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die genannten Gene
30 in coryneformen Bakterien verstärkt, die bereits D-Pantothensäure produzieren.

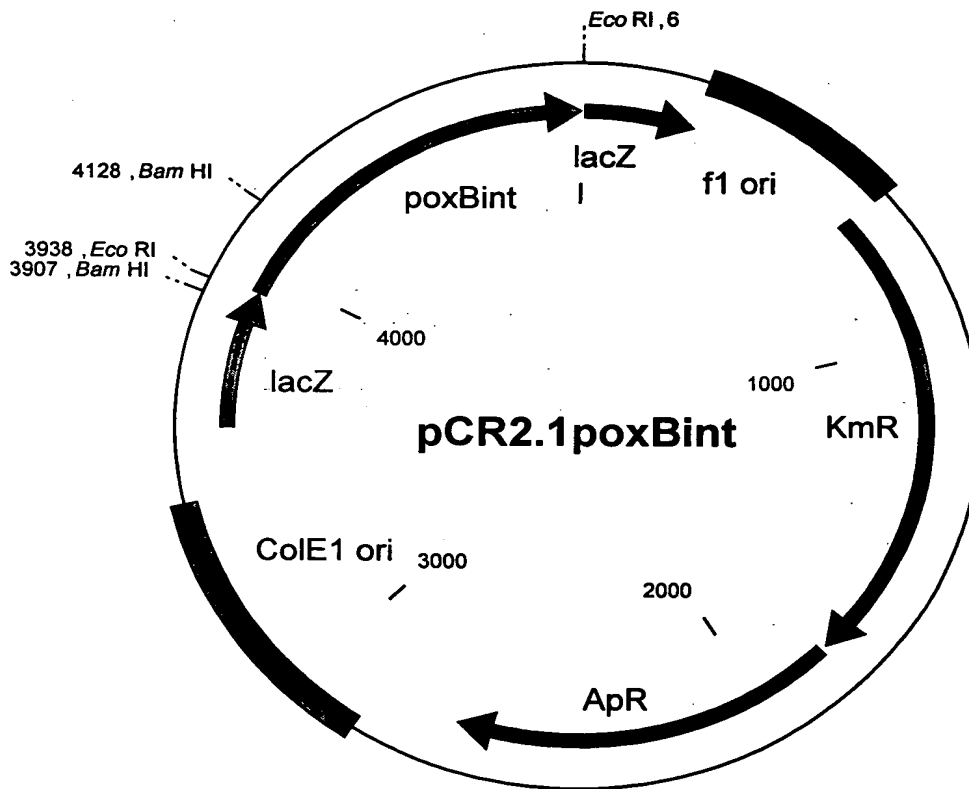
12. Verfahren gemäß den Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man coryneforme
Bakterien einsetzt die bereits D-Pantothensäure
produzieren, in denen man das pck Gen abschwächt.
- 5 13. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien das
stromaufwärts der SEQ ID No. 1 liegt, und in SEQ ID No.
6 dargestellt ist.
14. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien das
stromabwärts der SEQ ID No. 1 liegt und in SEQ ID No. 7
10 dargestellt ist.
15. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend eine Deletionsmutation des poxB-Gens
dargestellt in SEQ ID No. 12.
16. Coryneforme Bakterien, die die in SEQ ID No. 12
15 dargestellte Deletionsmutation tragen.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure durch Fermentation coryneformer Bakterien, bei dem man Bakterien einsetzt, in denen man die für die
5 Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierende Nucleotidsequenz (poxB-Gen) abschwächt, wobei man folgende Schritte ausführt:

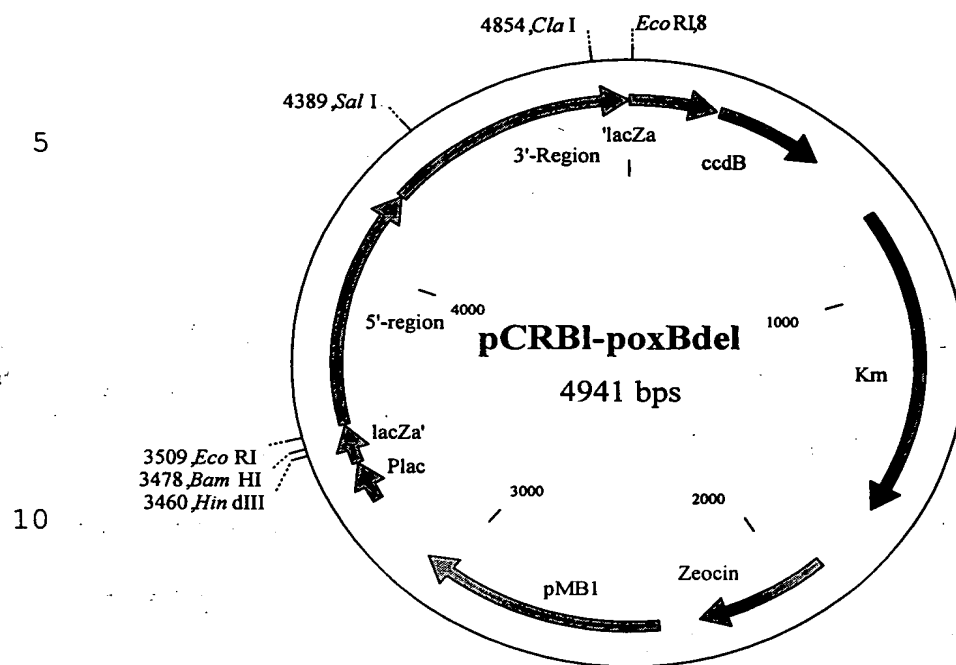
- 10 a) Fermentation der D-Pantothensäure produzierenden Bakterien, in denen zumindest das für Pyruvat-Oxidase kodierende Gen abgeschwächt wird;
- b) Anreicherung der D-Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien; und
- c) Isolieren der produzierten D-Pantothensäure.

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1poxBint



Figur 2:

3



15

20